

IDBO1884



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: 0 519 218 A2

② EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

② Anmeldenummer: 92108254.1

⑪ Int. Cl. 5: C12N 15/31, C12N 15/74,  
C12P 21/02, C07K 13/00,  
C12N 1/21, // (C12N1/21,  
C12R1:19)

② Anmeldetag: 15.05.92

② Priorität 17.05.91 DE 4116249

② Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
23.12.92 Patentblatt 92/52

② Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU MC  
NL PT SE

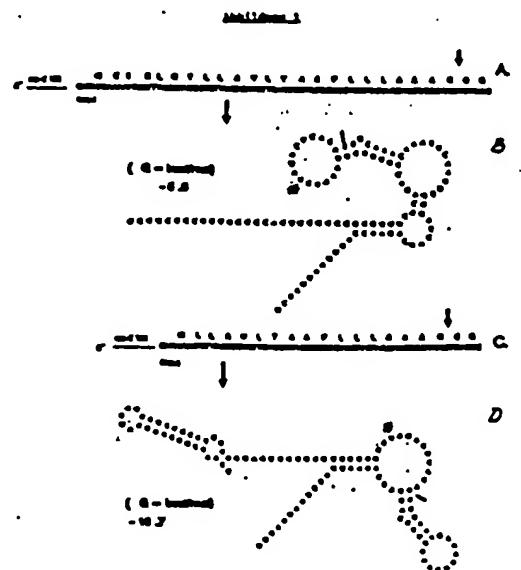
② Anmelder: Gesellschaft für  
Biotechnologische Forschung mbH (GBF)  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig-Stöckheim(DE)

② Erfinder: Singh, Mahavir, Dr.  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig(DE)  
Erfinder: Tlmmis, Kenneth, Prof.Dr.  
Mascheroder Weg 1  
W-3300 Braunschweig(DE)

② Vertreter: Boeters, Hans Dietrich, Dr. et al  
Boeters & Bauer Patentanwälte  
Bereiteranger 15  
W-8000 München 90(DE)

④ Hybrid-Plasmid für 38 kDa Antigen von *M. Tuberculosis*, *E. coli* als Wirt, 38 kDa Antigen und etwa 33  
kDa Protein.

④ Die Erfindung betrifft ein Hybrid-Plasmid zur Expression eines unfusionierten 38-kDa-Antigens von *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli*, *E. coli* als Wirt des Hybrid-Plasmids so wie das 38-kDa-Antigen.



kodierende DNA-Sequenz gemäß Abb. 1 A oder 1 C gekennzeichnet sein.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung *E. coli* mit einem erfindungsgemäßen Hybrid-Plasmid.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein 38-kDa-Antigen (Prä-Protein) von *M. tuberculosis*, herstellbar mit Hilfe von *E. coli* gemäß der Erfindung, wobei die Signalsequenz 17 bis 24

5 Kodons umfaßt, wobei eine Signalsequenz mit 23 Kodons ausgenommen ist.

Dieses 38-kDa-Antigen (Prä-Protein) kann durch 22 bis 17 Aminosäuren der folgenden Signalsequenz:

MKIRLHTLAVLTAAPLLAAG.

beispielsweise die Aminosäuren 1 mit 8 bis 23 gekennzeichnet sein.

10 Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein etwa 33 kDa großes Protein, erhältlich mit Hilfe von *E. coli* als Wirt von pJLA 603 als Expressions-Plasmid, wobei

- eine das 38-kDa-Antigen von *M. tuberculosis* (Prä-Protein) kodierende DNA-Sequenz N-terminal in eine Ncol-, Ndel- oder Sphi-Schnittstelle von pJLA 603 eingesetzt worden ist,

- diese eingesetzte DNA-Sequenz die Signalsequenz des Antigens umfaßt,

15 - die Erkennungssequenz der Schnittstelle das Basentriplett ATG umfaßt, das das in Leserichtung erste Kodon M kodiert und

- das etwa 33 kDa große Protein gegebenenfalls vom gleichfalls exprimierten 38-kDa-Antigen separiert wird.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein etwa 33 kDa großes Protein, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es gegenüber dem 38-kDa-Antigen von *M. tuberculosis* (Prä-Protein) N-terminal um die Signalsequenz und weitere 24 Aminosäuren deletiert ist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein 38-kDa-Antigen von *M. tuberculosis* und/oder etwa 33 kDa großes Protein, hergestellt mit Hilfe von *E. coli* gemäß der Erfindung und folgendermaßen renaturiert:

25 - Solubilisieren des als Einschlußkörper angefallenen Antigens und/oder Proteins in Guanidinium-HCl (gegebenenfalls in Gegenwart eines reduzierenden Agens) und

- nachfolgendes Renaturieren mit Hilfe von Sephadex-Chromatographie.

Dieses 38-kDa-Antigen und/oder etwa 33 kDa große Protein kann dadurch gekennzeichnet sein, daß man

30 - bei der Solubilisierung mit etwa 6 M Guanidinium-HCl und/oder in Gegenwart von Dithiothreit (DTT) gearbeitet hat und/oder

- die Renaturierung mit Hilfe von Sephadex G-25 durchgeführt hat.

Erfindungsgemäß wurden rekombinante Plasmide konstruiert, welche in *Escherichia coli* in hohen Spiegeln das 38 kDa-Antigen von *M. tuberculosis* produzieren. Mit den erfindungsgemäßen rekombinanten

35 Konstrukten können große Mengen von unfusioniertem (einzigartigem) 38 kDa-Protein in *E. coli*, hauptsächlich in Form von Einschlußkörperchen hergestellt werden. Außerdem wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung des rekombinanten Antigens aus den Einschlußkörperchen entwickelt. Das auf diese Weise hergestellte, gereinigte 38 kDa-Antigen ist immunologisch nicht unterscheidbar von dem nativen 38 kDa-Antigen von *M. tuberculosis*. Aufgrund seiner hohen Spezifität für

40 *M. tuberculosis* kann dieses rekombinante Antigen weltweit nutzbringend zur serologischen Diagnostik der Tuberkulose eingesetzt werden. Das Antigen ist ebenso ein potentieller Kandidat für Impfstoffe gegen Tuberkulose, weil es immundominante T-Zell-Epitope umfaßt.

Das Gen, welches für das 38 kDa-Antigen kodiert, wurde bereits kloniert und wird in der vorliegenden Erfindung als unfusioniertes Protein in *Escherichia coli* unter der Kontrolle starker transkriptionaler

45 (Bakteriophage lambda  $P_R P_L$ ) und translationaler ( $stpE$ ) Signale exprimiert. Die Fermentation einer Ion-Protease und die Hitzeschockantwort fehlen, stellte das rekombinante Antigen in hohen Spiegeln zur Verfügung (etwa 10 % des gesamten Zellproteins). Das rekombinante Antigen, das als Einschlußkörperchen akkumulierte, wurde vollständig in 6 M Guanidiniumhydrochlorid solubilisiert, wieder gefaltet und erschien

50 nach der Reinigung homogen. Das Produkt zeigte die erwartete Aminosäurenzusammensetzung und das erwartete Molekulargewicht, und ebenfalls gleichstarke Reaktivitäten mit drei verschiedenen monoklonalen Antikörpern wie das native Protein. Polyklonale Antikörper, die gegen das rekombinante Antigen entwickelt worden waren, reagierten in einem enzymgekoppelten Immunosorbent-Assay stark mit dem nativen Antigen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß das rekombinante 38 kDa-Antigen, welches immunologisch nicht von dem nativen Protein aus *M. tuberculosis* unterschieden werden kann, in ausreichenden Mengen in *E. coli*

55 produziert werden kann.

#### Beschreibung der Abbildungen

5 B: Laserdensitometrischer Vergleich der Immunreaktivität des nativen und des rekombinanten 38 kDa-Proteins. Das silbergefärbte Gel und der Immunoblot aus Teil (A) wurden mit einem Laserdensitometer abgetastet. Die Peakflächen des silbergefärbten nativen (Nat. Silver) und des rekombinanten Proteins (Rec. Silver) ebenso wie jene des Immunogelblotteten nativen (Nat. Immuno) und des rekombinanten Proteins (Rec. Immuno) sind dargestellt.

10 Abbildung 8: A: Titrationskurven von polyklonalen Sera mit dem 38 kDa-Antigen. Sera von Kaninchen, die mit dem nativen (Punkt) oder dem rekombinanten 38 kDa-Protein (ausgefülltes Kästchen) immunisiert wurden. Serielle zweifache Verdünnungen, beginnend mit einer 1:100-Verdünnung, wurden in Mikrotiterplatten titriert, die mit der Präparation I des rekombinanten 38 kDa-Proteins beschichtet worden waren (0.1 µg/Vertiefung). Die gebundenen Immunglobuline wurden mittels an anti-Kaninchen-Immunglobuline vom Schwein gekoppelte Meerrettichperoxidase in 1:1000-facher Verdünnung (P 217, Dakopatts, Glostrup, DK) nachgewiesen.

15 B: Wie (A) mit der Ausnahme, daß die Mikrotiterplatten mit dem nativen 38 kDa-Antigen beschichtet worden waren (0.1 µg/Vertiefung).

20 Im folgenden wird die Erfindung im Detail erläutert.

#### Material und Methoden

##### **Bakterienstämme, Phagen, Plasmide und Wachstumsbedingungen.**

25 Die in dieser Erfindung verwendeten *E. coli*-Stämme waren TG-1 (*Δlac-pro, supE, thi, hsdS/F' traD36, proA<sup>r</sup> B<sup>r</sup>, lacI<sup>r</sup>, lacZ*ΔM15), DH5alpha (*endA1, recA1, hsdR17, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, lacZYA-argF*),  $\phi$  80d/*lacZ*ΔM15), EC 538 und CAG629 (lon, *htrR165-Tn10*; C. Gross). Der rekombinante Lambda gt11-Bakteriophage, Klon AA59, wurde in einer früheren Untersuchung (3) aus einer genomischen DNA-Bibliothek von *M. tuberculosis* (konstruiert von R. A. Young (27)) isoliert.

30 Wenn nicht anderweitig angegeben, wurden die Stämme in Luria-Bertani-Medium (15) bei 37°C kultiviert. Die flüssigen Kulturen wurden mit Sauerstoff versorgt, indem sie mit 160 Upm in einem Pilot-Shake-Schüttler (Kühne, Schweiz) umgewälzt wurden.

##### **DNA-Manipulationen.**

35 Präparation und Behandlung der DNA wurden gemäß standardisierten Protokollen ausgeführt (15). Die Transformation wurde wie bei Hanahan beschrieben bewerkstelligt (8). Die DNA-Sequenzierung wurde mittels Dideoxynukleotid-Kettenabbruchmethode durchgeführt (18). Oligonukleotide wurden auf einem DNA-Synthesizer von Applied Biosystems, Modell 380B, hergestellt und über OPC-Säulen (Applied Biosystems Inc.) gereinigt.

##### **Oligonukleotid-Mutagenese.**

40 Das 2.0 kb EcoRI-Fragment aus dem genomischen Klon Lambda-AA59 (3) wurde in M13mp19 transferiert. Die Präparation von einzelsträngiger DNA und die Oligonukleotid-Mutagenese wurden unter Verwendung des Amersham-Kits (RPN 1523) durchgeführt. Die DNA-Sequenz des Oligonukleotids vor und 45 nach Mutagenisierung wurden durch DNA-Sequenzierung (18) bestätigt.

##### **Präparation eines groben Proteinextrakts in kleinem Maßstab.**

45 Die Stämme wurden in LB-Medium, supplementiert mit Ampicillin (100 µg/ml), bei 30°C bis zu einer Absorption von 0.6 bei 580 nm kultiviert. Die Kulturen wurden durch dreistündige Temperaturerhöhung auf 50 42°C in einem Schüttelwasserbad induziert. Bakterien aus 1 ml Kulturmischung wurden geerntet, in 100 µl Probenpuffer (62 mM Tris-HCl, pH 8.8; 2 % Natriumlaurylsulfat; 0.7 M 2-Mercaptoethanol; 10 % Glycerol; 0.002 % Bromphenolblau) suspendiert und durch Behandlung mit Ultraschall auf Eis (3 x 30 Sekunden; 50 W) unter Verwendung eines Braun Labsonic 2000 aufgebrochen. Die Proben wurden 10 Minuten lang auf 55 95°C erhitzt und 10 µl wurden mittels Polyacrylamidgelektrophorese analysiert.

##### **Kultivierung im Bioreaktor.**

Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase (BRL, Gaithersburg, MD, USA) ausgeführt. Für einen Immuno-Dot-Blot-Assay wurden die Proteinproben durch eine Nitrocellulosemembran unter Verwendung eines BioRad Bio-Dot-Apparates gefiltert und dann wie oben beschrieben behandelt. Die monoklonalen Antikörper HAT2, HBT12 und HYT28 wurden früher beschrieben (2, 12, 21). Densitometrische Messungen der silbergefärbten Gele und der Western Blots wurden mit einem Laserdensitometer (LKB) vorgenommen.

**5 Aminosäureanalyse.**

Die Aminosäureanalysen wurden mit einem Biotronik LC-5001 Aminosäureanalyser (Maintal, FRG) 10 durchgeführt, nachdem die Proteinprobe in 6 N HCl, die 0.1 % Phenol enthielt, über 24 Stunden bei 105 °C hydrolysiert worden war.

**Herstellung der polyklonalen anti-38 kDa-Protein-Sera.**

15 Kaninchen wurden subkutan entweder mit affinitätschromatographisch gereinigtem 38 kDa-Protein (25) oder mit rekombinantern 38 kDa-Protein (Präparation I) immunisiert. Das Antigen (10 µg/Dosis) wurde an Aluminiumhydroxid (2.4 mg) adsorbiert und nachfolgend mit 1 ml Freund's inkomplettem Adjuvant 20 gemischt. Die Kaninchen wurden drei Mal mit Intervallen von zwei Wochen immunisiert. Blut wurde 10 Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen und die IgG-Fraktion nach der Methode von Harboe und Ingild 25 (9) gereinigt.

**Elektronenmikroskopie.**

25 Die Zellen wurden mit 1 % Formaldehyd und 0.2 % Glutaraldehyd in PBS (50 mM K-Phosphat, 0.9 % NaCl, pH 6.9) eine Stunde lang auf Eis fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen 30 gemäß der progressiven Temperaturniedrigungsmethode (PLT), (17), eingebettet. Die Zellen wurden zuerst mit 10 %, dann mit 30 % Ethanol über 30 Minuten auf Eis, anschließend mit 50 % Ethanol über 30 Minuten bei -20 °C, und schließlich mit 70 %, 90 % und 100 % Ethanol bei -35 °C jeweils 30 Minuten lang und mit 100 % Ethanol bei -35 °C 1 Stunde lang dehydratisiert. Die Infiltration mit dem Lowicrylharz K4M 35 wurde wie folgt ausgeführt: 1 Teil Ethanol/1 Teil K4M-Harz über Nacht bei -35 °C, 1 Teil Ethanol/2 Teilen K4M-Harz 12 Stunden lang und reines K4M-Harz 2 Tage lang bei -35 °C mit mehrmaligem Wechseln der Harzmischung. Die Polymerisierung des Harzes wurde durch UV-Licht (366 nm) über 1 Tag bei -35 °C und bei Raumtemperatur über weitere 2 Tage erreicht. Ultradünnsschnitte wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat 40 nachgefärbt, bevor man sie mit einem Zeiss EM 10B Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 80 kV untersuchte.

**Ergebnisse**

**Konstruktion der Expressionsplasmide.**

40 Die DNA-Sequenzierung des 38 kDa-Proteingens ergab ein offenes Leseraster, das ein Polypeptid mit 374 Aminosäuren kodierte und GTG als das Startcodon enthielt (1). Ebenso fand sich eine 24 Aminosäuren lange Signalsequenz (Abbildung 1A), die Ähnlichkeiten mit jenen von bakteriellen Lipoproteinen aufwies. In der vorliegenden Erfindung wurde das Gen manipuliert, so daß in dem Expressionsvektor pJLA803 45 (Abbildung 2) in hohem Ausmaß das unfusionierte 38 kDa-Antigen exprimiert werden konnte. Zur Klonierung und Expression in derartigen Vektoren ist es erforderlich, daß das fremde Gen eine Restriktionsschnittstelle aufweist, zum Beispiel Ncol, Ndel, SphI, welche innerhalb ihrer Erkennungssequenz ATG im Leseraster umfaßt. Weil sich keine derartige Schnittstelle in der Region um das Initiationscodon des 38 kDa-Gens befindet, wurde eine Oligonukleotid-Mutagenese in M13mp18 durchgeführt, um einen Austausch des 50 Startcodons von GTG zu ATG und eine Ndel-Schnittstelle am N-Terminus vorzusehen (Abbildungen 1 und 2). Das 1.2 kb Ndel-SphI-Fragment, das aus dem M13-Derivat nach Mutagenisierung herausgeschnitten werden konnte, wurde dann zwischen die Ndel-SphI-Schnittstellen von pJLA603 kloniert. Das rekombinante Plasmid, welches so konstruiert war, daß das 38 kDa-Protein mit seinem ursprünglichen, intakten Signalpeptid exprimiert werden konnte, wurde pMS9-2 genannt. In gleicher Weise wurde ein anderes rekombinantes 55 Plasmid, pMS10-4, welches eine Deletion der ersten 6 Aminosäuren in der Signalsequenz aufwies, hergestellt (Abbildung 1C). Eine Computeranalyse der Translationsinitiationsregion der von pMS9-2 spezifizierten m-RNA sagte eine lockere Sekundärstruktur voraus (Abbildung 1B), welche für eine hochgradige Expression in *E. coli* sehr vorteilhaft sein sollte (14). Auf der anderen Seite zeigte pMS10-4 eine stabilere

Die beiden Seren wurden nachfolgend im enzymgekoppelten Immunosorbent Assay (ELISA) sowohl gegen das rekombinante (Abbildung 8A) als auch das native Antigen (Abbildung 8B) getestet. Die Steilheit der Kurven ist identisch, was zeigt, daß die beiden Seren das native und das rekombinante 38 kDa-Protein gleich gut binden.

5 Die Aminosäurenzusammensetzung des rekombinanten 38 kDa-Proteins gibt ziemlich gut die Aminosäurenkomposition wieder, die sich aus der Nukleotidsequenz ableiten läßt (Tabelle 1).

Etwa 33 kDa großes Protein. Die Kürzung im Vergleich zum 38 kDa-Antigen hat die Signalsequenz völlig entfernt. Jedoch reagiert das gekürzte Protein stark mit den monokonalen Antikörpern HAT2, HBT12 und HYT28, was zeigt, daß die drei Epitope intakt sind.

10 Reaktion im ELISA- und im Western-Blotting-Test gegenüber Seren von Mäusen, die mit *Mycobacterium tuberculosis* infiziert worden waren. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde festgestellt, daß etwa 85 % der Seren von Tuberkulose-Patienten positiv mit dem gekürzten Protein bzw. dem gekürzten Antigen reagierten, was zeigt, daß das gekürzte Antigen wirksam zur Diagnose eingesetzt werden kann.

## 15 Diskussion

Es wurde eine Strategie entwickelt und ausgeführt, ein DNA-Fragment von *Mycobacterium tuberculosis* in einen Expressionsvektor zu klonieren, so daß unfusioniertes 38 kDa-Protein in hohem Ausmaß produziert werden würde. Der Vektor umfaßte den Lambda-P<sub>R</sub>P<sub>L</sub>-Promotor und die effiziente Translationsinitiationsregion des *atpE*-Gens, was eine Expression des heterologen 38 kDa-Antigens in *E. coli* in einem Ausmaß bewirkte, das 10 % des gesamten Zellproteins entsprach. Etwa 15 mg rekombinantes Protein/Liter wurde unter diesen gegebenen Bedingungen hergestellt. Es sollte allerdings betont werden, daß das Ziel der vorliegenden Erfindung war, herauszufinden, ob das Überexprimierte rekombinante Antigen in einer antigenen Form gefunden werden konnte, die immunologisch nicht unterscheidbar von dem nativen Antigen ist, das man aus *Mycobacterium tuberculosis* gewinnt, und nicht, die Fermentationsausbeuten zu optimieren.

Der Hauptanteil des rekombinanten 38 kDa-Proteins akkumulierte in Form von Einschlußkörperchen. 6 M Guanidinium-HCl in Gegenwart eines reduzierenden Agens (DTT) in hoher Konzentration stellte sich als am besten geeignet für die Solubilisierung der Einschlußkörperchen heraus. Die Renaturierung der Proteine 20 der Einschlußkörperchen, insbesondere der hydrophoben Membranproteine, ist oft schwierig und es bedarf einer sorgfältigen Optimierung der experimentellen Bedingungen. In unserem Fall bewirkte das übliche Verfahren der Dialyse oder schrittweisen Dialyse eine Präzipitation des rekombinanten 38 kDa-Proteins, selbst bei sehr niedrigen Proteinkonzentrationen (0.05 mg/ml). Die Renaturierung des rekombinanten Proteins auf Sephadex G-25 stellte sich auf anderen Seite als effektiv heraus, und es wurde keine 25 signifikante Reaggregation des Proteins beobachtet. Beginnend mit den Einschlußkörperchen, die etwa 200 mg Gesamtprotein enthalten, konnten wir 19 mg des 38 kDa-Proteins mit einer Reinheit von größer 95 % darstellen, wie an silbergefärbten SDS-PAGE-Gelen gezeigt wurde.

Das 38 kDa-Antigen aus *M. tuberculosis* ist höchstwahrscheinlich ein Lipoprotein (D.B. Young und T.R. Garbe, Res. Microbiol. 142- (1991), im Druck). Lipoproteine zeigen aberrante, diffuse Banden auf SDS-PAGE-Gelen (16, 22). Wie es auch für andere Lipoproteine gilt, beobachteten wir eine deutliche Tendenz des rekombinanten 38 kDa-Antigens zur Aggregation während der Anionenaustauschchromatographie und während der Konzentrierung durch Ultrafiltration. Ein Teil des Antigens, welcher während der Ultrafiltration aggregierte, konnte durch Solubilisierung in 2 % Triton X-100, gefolgt von FPLC auf Mono Q, wiedergefunden werden.

45 Das native 38 kDa-Protein erscheint auf SDS-Polyacrylamidgelen als Doppelbande. Der Grund hierfür ist nicht bekannt, er könnte jedoch von einer Acylierung und Prozessierung des Prä-Proteins herführen. Wir haben die Signalsequenz nicht entfernt, bevor wir das Antigen in großen Mengen herstellten, weil die Anwesenheit von Lipoylanteilen am N-terminalen Cystein eine wichtige Rolle in der Immunogenität von Proteinantigenen spielen könnte (6). Das rekombinante Protein, welches in dieser Erfindung gereinigt wurde, 50 zeigte ebenfalls eine Doppelbandencharakteristik. Die Präparation I enthält hauptsächlich die obere Bande und nur geringe Mengen der unteren Bande. Präparation II enthält sowohl die obere als auch die untere Bande in fast gleichen Mengen. Präparation III repräsentiert ein proteolytisch verkürztes Derivat (etwa 33 kDa) des 38 kDa-Antigens.

Das native 38 kDa-Protein, welches aus dem Kulturrüberstand von *M. tuberculosis* isoliert wird, und das gereinigte rekombinante Protein, das man in den Präparationen I und II findet, wiesen die gleiche Größe auf und zeigten auf SDS-PAGE-Gelen einen Doppelbandencharakter. Außerdem zeigten die gereinigten Proteine und das native Antigen auf Immunoblots eine identische Reaktion mit den monokonalen Antikörpern HAT2, HBT12 und HYT28. Ein polyklonales Serum, welches gegen das rekombinante Protein (Präparation I)

Molec. Microbiol. 2:455-465.

15. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor , N.Y.

16. Pugsley, A.P., C. Chapon, and M. Schwartz. 1986. Extracellular pullulanase of *Klebsiella pneumoniae* is a lipoprotein.  
J. Bacteriol. 166:1083-1088.

17. Roth, J., M. Bendayan, E. Carlénalm, W. Villiger, and M. Garavito. 1981. Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatic tissue.  
J. Histochem. Cytochem. 29:663-669.

18. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.

19. Sammientos, P., M. Duchesne, P. Denefle; J. Boiziau, N. Fromage, N. Delaporte, F. Parker, Y. Lelièvre, J-F. Mayaux, and T. Cartwright. 1989. Synthesis and purification of active human tissue plasminogen activator from *Escherichia coli*.  
Biotechnology 7:495-501

20. Schauder, B., H. Blöcker, R. Frank, and J.E.G. McCarthy. 1987. Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli* *atpE* translational initiation region.  
Gene. 52:279-283.

21. Schou, C., Z.-L. Yuan, A.B. Andersen, and J. Bennedsen. 1985. Production and partial characterisation of monoclonal hybridoma antibodies to *Mycobacterium tuberculosis*.  
Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C 93:265-272

22. Schouls, L.M., R. Mount, J. Dekkert, and J.D.A. van Embden. 1989. Characterisation of lipid-modified immunogenic proteins of *Treponema pallidum* expressed in *Escherichia coli*.  
Microbiol. Pathogen. 7:175-188.

23. Styblo, K. 1989. Overview and epidemiological assessment of the current global tuberculosis situation with an emphasis on control in developing countries.  
Rev. Infect. Dis. 11:5339-5346.

24. Worsaae, A., L. Ljungqvist, K. Haslov, I. Heron, and J. Bennedsen. 1987. Allergenic and blastogenic reactivity of three antigens from *Mycobacterium tuberculosis* in sensitized guinea pigs.  
Infect. Immun. 55:2922-2927.

25. Worsaae, A., L. Ljungqvist, and I. Heron. 1988. Monoclonal antibodies produced in BALB.B10 mice define new antigenic determinants in culture filtrate preparations of *Mycobacterium tuberculosis*.  
Infect. Immun. 56:2608-2614.

26. Young, D., L. Kent, A. Rees, J. Lamb, and J. Ivanyi. 1988. Immunological activity of a 38 kDa-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*.  
Infect. Immun. 54:177-183.

27. Young, R.A., B.R. Bloom, C.M. Grosskinsky, J. Ivanyi, D.D. Thomas, and R.W. Davis. 1985. Dissection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens using recombinant DNA.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:2583-2587.

28. Zucker, M., and P. Stiegler. 1981. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information.  
Nucl. Acids Res. 9:133-148.

## Lebendmaterial

45 Lambda-AA59: genetischer Klon für 2,0-kb-EcoRI-Fragment  
Zugang: Literatur (3); DSM 6524

M13mp19: Phagen zur Transferierung für 2,0-kb-EcoRI-Fragment  
Zugang: Pharmacia

50 pJLA603: Vektor zur Aufnahme eines NdeI-SphI-Fragments von M13mp19 nach Transferierung des 2,0-kb-EcoRI-Fragments und Mutagenisierung  
Zugang: Literatur (20); Medac (Hamburg)

8. 38-kDa-Antigen (Prä-Protein) nach Anspruch 7, gekennzeichnet durch 22 bis 17 Aminosäuren der folgenden Signalsequenz:

5 1 23 MKIRLHTLLAVLTAAPLLLAAAG,

beispielsweise die Aminosäuren 1 mit 8 bis 23.

10 9. Etwa 33 kDa großes Protein, erhältlich mit Hilfe von *E. coli* als Wirt von pJLA 603 als Expressions-  
Plasmid, wobei

- eine das 38-kDa-Antigen von *M. tuberculosis* (Prä-Protein) kodierende DNA-Sequenz N-terminal in eine Ncol-, NdeI- oder SphI-Schnittstelle von pJLA 603 eingesetzt worden ist,
- diese eingesetzte DNA-Sequenz die Signalsequenz des Antigens umfaßt,
- die Erkennungssequenz der Schnittstelle das Basentriplett ATG umfaßt, das die in Leserichtung erste Aminosäure M kodiert, und
- das etwa 33 kDa große Protein gegebenenfalls vom gleichfalls exprimierten 38-kDa-Antigen separiert wird.

25 10. Etwa 33 kDa großes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es gegenüber dem 38-kDa-Antigen von *M. tuberculosis* (Prä-Protein) N-terminal um die Signalsequenz und weitere 24 Aminosäuren deletiert ist.

11. 38-kDa-Antigen von *M. tuberculosis* und/oder etwa 33 kDa großes Protein, hergestellt mit Hilfe von *E. coli* gemäß Anspruch 6 und folgendermaßen renaturiert:

- Solubilisieren des als Einschlußkörper angefallenen Antigens und/oder Proteins in Guanidinium-HCl (gegebenenfalls in Gegenwart eines reduzierenden Agens) und
- nachfolgendes Renaturieren mit Hilfe von Sephadex-Chromatographie.

25 12. 38-kDa-Antigen und/oder etwa 33 kDa großes Protein nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man

- bei der Solubilisierung mit etwa 6 M Guanidinium-HCl und/oder in Gegenwart von Dithiothreitol (DTT) gearbeitet hat und/oder
- die Renaturierung mit Hilfe von Sephadex G-25 durchgeführt hat.

Abbildung 2

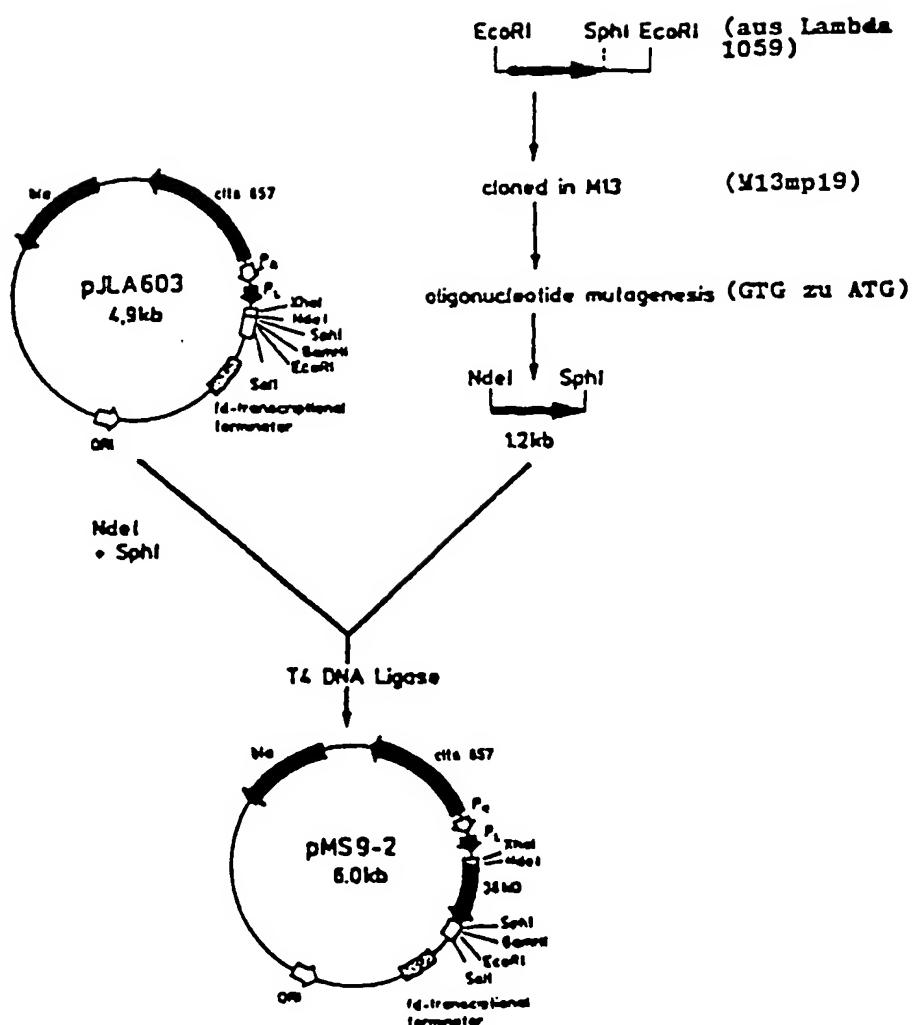


Abbildung 4

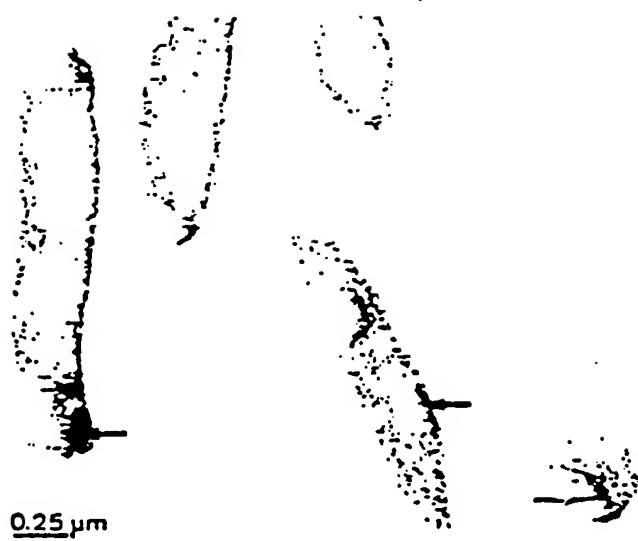


Abbildung 6

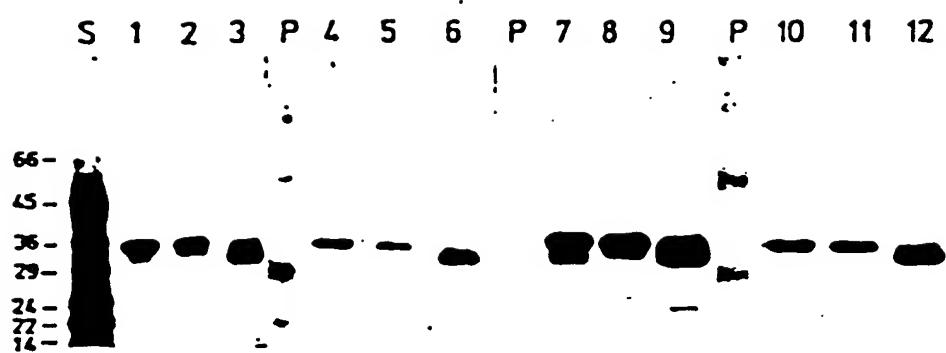


Abbildung 8

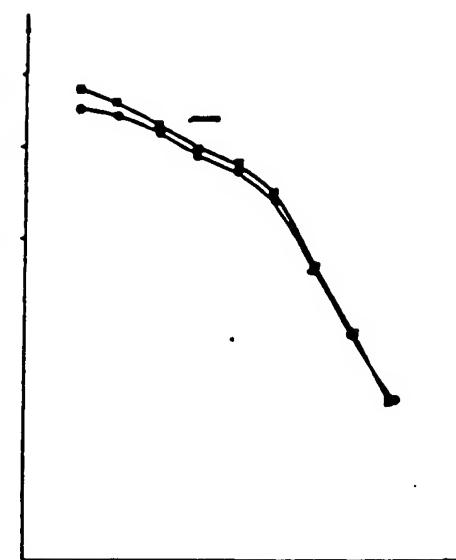
A

$A_{490}$

3.0

2.0

1.0



zweifache Verdünnung

B

$A_{490}$

3.0

2.0

1.0



zweifache Verdünnung